

알칼리성 Xylanase를 생산하는 *Bacillus alcalophilus* AX2000의 분리와 효소 생산

박영서* · 김태영
경원대학교 공과대학 생명공학부

Isolation of *Bacillus alcalophilus* AX2000 Producing Alkaline Xylanase and Its Enzyme Production.
Park, Young Seo* and Tae-Young Kim. Division of Biotechnology, Kyungwon University, Seongnam 461-701, Korea – An alkali-tolerant bacterium producing the xylanase was isolated from soil and identified as *Bacillus alcalophilus*. This strain, named *B. alcalophilus* AX2000, was able to grow and produce xylanase optimally at pH 10.5 and 37°C. The maximum xylanase production was obtained when 0.5%(w/v) birchwood xylan and 0.5%(w/v) polypeptone and yeast extract were used as carbon source and nitrogen source, respectively. The biosynthesis of xylanase was under the catabolite repression by glucose in the culture medium, and inhibited in the presence of high concentration of xylose. The maximum activity of xylanase was observed at pH 10.0 and 50°C and the enzyme activity remained was over 80% at 60°C and from pH 5.0 to 11.0.

Key words: *Bacillus alcalophilus*, xylanase, alkali-tolerant, enzyme production

Xylan은 자연에 존재하는 다당류 중에서 두 번째로 풍부한 물질로서 5탄당인 D-xylose가 β -1,4 결합을 하는 중합체의 형태로 떡갈나무나 일년생 농작물에서 주로 발견된다. Xylan은 일반적으로 acetyl기, arabinosyl기, glucuronosyl기 등의 측쇄를 가지고 있는 복잡한 구조를 지니며[3], 나무에 존재하는 xylan은 hard wood와 soft wood의 두 가지 형태로 존재하는데 일반적으로 hardwood에는 acetylated xylan의 형태로, softwood에는 arabinoxylan으로 존재한다[1, 31, 32]. Hardwood에는 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid와 acetyl기가 각각 xylose 잔기의 약 10%와 70% 비율로 존재하며 softwood에는 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid와 arabinosyl기가 각각 xylose기의 약 18%와 12% 비율로 존재하고 있다. Hemicellulose의 구성성분 중 xylan은 떡갈나무에는 약 60~80%, 벚짚에 35%, 보릿짚에 31%, 옥수수 껍질에는 15%가 존재하고 있다.

Xylan은 그 자체로서는 이용가치가 별로 없으나 xylose 단위로 분해되면 이용성이 증가되기 때문에 xylan을 분해하는 효소에 관하여 세균이나 곰팡이를 대상으로 오래전부터 많은 연구가 진행되어 왔다[14, 30]. Xylan을 가수분해하여 xylose 또는 xylooligosaccharide로 전환시키는 효소인 xylanase는 동식물과 미생물 등 자연계에 널리 분포되어 있으며 β -1,3 xylanase [exo-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylanase(EC.3.2.1.72),

endo-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylanase(EC.3.2.1.32)]와 (1 \rightarrow 4)- β -D-xylan xylanohydrolase[Endo-xylanase(EC.3.2.1.8), exo-xylanase (EC.3.2.1.37)]가 있다[34, 35]. β -1,3 Xylanase는 주로 해초나 해조류에 존재하는 β -1,3 xylan을 분해하는데 *Chaetomium globosum*과 *Irpex luteus* 등 극히 한정된 미생물만이 생산하는 것으로 보고되고 있다. 그러나 일반적으로 xylanase는 고등식물에 존재하는 (1 \rightarrow 4)- β -D-xylan의 (1 \rightarrow 4)- β -D-xylan xylopyranosyl linkage를 절단하는 효소로서 그 중 세균 유래의 xylanase는 주로 endo-type으로 작용하고 곰팡이 유래의 xylanase는 exo나 endo-type으로 작용하는 것으로 보고되어 있다. Xylanase는 자연계에 풍부한 목질계 바이오매스로부터 ethanol 등과 같은 바이오에너지의 생산, 목질계로부터 양질의 pulp 생산, 가축의 사료제조, 식품첨가물 등 생물공학산업에 유용하게 사용될 수 있어 최근 그 산업적 중요성이 강조되고 있다[10, 14, 33]. 특히 최근에는 pulp 생산에 xylanase를 이용한 효소법이 상용화되고 있으며, 이 경우 알칼리 조건에서 공정이 이루어지기 때문에 알칼리성 xylanase를 생산하는 균주의 분리와 효소의 정제 및 특성에 관한 분석이 요구되고 있다. Xylanase는 주로 *Bacillus*속과 *Aspergillus*속 미생물이 주로 생산하며 *Bacillus*속 미생물이 생산하는 xylanase는 D-xylose에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 산업적으로 유용한 미생물 유래의 xylanase를 생산하는 균주를 분리하여 동정하였고 배양 특성과 xylanase 효소의 특성을 조사하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-31-750-5378 Fax: 82-31-750-5273

E-mail: ypark@kyungwon.ac.kr

재료 및 방법

배지

토양으로부터 xylanase를 생산하는 균주의 분리에는 기본 한천배지(0.5% oat-spelts xylan, 0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1% Na_2CO_3 , 1.5% agar, pH 10.5)를 사용하였다.

시약

Birchwood xylan, oat-spelts xylan은 Sigma사 제품을 사용하였고 bacto-tryptone, bacto-yeast extract는 Difco사 제품을 사용하였다.

균주 분리 및 동정

Xylanase를 생산하는 알칼리 내성 균주를 탐색하기 위하여 경기도 지역의 토양을 채집한 후 10 ml의 0.88%(w/v) NaCl 용액에 1 g의 토양을 현탁시키고 10분간 정치하였다. 상등액 50 μ l를 0.5%(w/v) oat-spelts xylan이 함유된 기본한천배지에 도말하여 37°C에서 2일간 배양한 뒤 colony 주위에 투명한 환을 형성하는 균주를 xylanase 생산 균주로 선별하였다.

분리균주의 동정은 형태학적, 생화학적 특성, 지방산 조성 및 16S rRNA 유전자의 염기서열을 조사함으로써 실시하였다. 분리균주의 형태학적 특성을 관찰하기 위해 Gram 염색, 포자염색을 실시하였고 주사전자현미경을 사용하여 외형을 조사하였다. 생화학적 특성은 Biolog사의 Microbial Identification System™을 사용하였으며 gas chromatography에 의한 지방산 분석법과 16S rRNA 유전자 염기서열의 분석은 한국 중균협회 부설 한국미생물보존센터에 의뢰하였다.

Xylanase 활성측정

Xylanase 활성 측정은 Somogyi의 환원당 정량법[29]에 의하여 수행하였다. 1%의 xylan 용액(oat-spelts xylan in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) 400 μ l에 효소 용액 100 μ l를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후, alkaline copper reagent를 400 μ l 가한 뒤 100°C에서 10분간 가열하여 효소 반응을 정지시켰다. 반응액을 수돗물로 냉각한 후 Nelson's reagent를 400 μ l 가하고 2.6 ml의 증류수로 희석하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 D-xylose를 0.1~1.0 μ mol 사용하였고, 효소 1 unit는 주어진 조건에서 분당 1 μ mol의 D-xylose를 생성할 수 있는 효소의 양으로 정하였다.

조효소액의 조제

본 균주가 생산하는 xylanase 조효소액을 조제하기 위하여 기본배지에서 하룻밤 생육시킨 균주의 중배양액을 1%(v/v)되게 본배양액에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 250 rpm

으로 진탕 배양하였다. 이 배양액을 15,000 \times g에서 5분간 원심분리하여 얻어진 배양 상등액을 본 연구의 조효소액으로 사용하였다.

결과 및 고찰

Xylanase 생산균주의 분리와 동정

토양 현탁액을 0.5%(w/v) oat-spelts xylan이 첨가된 기본한천평판배지(pH 10.5)에 도말한 후 37°C에서 2일간 배양하여 형성된 콜로니 주위에 xylan을 분해함으로써 형성되는 투명한 환을 관찰하여 알칼리성 xylanase를 생산하는 균주를 탐색하였으며 이 중에서 xylanase 생산성이 가장 높은 균주를 1주 분리하여 본 연구에 사용하였다. 본 균주를 기본배지를 사용하여 37°C에서 24시간 동안 액체 배양한 후 xylanase 효소활성을 측정된 결과 1.0 U/ml의 효소활성을 나타내었다.

본 균주는 호기성으로 운동성을 지니며 Gram 염색에 의해 Gram 양성균주로 밝혀졌으며 포자를 형성하며 catalase 활성을 지니는 단간균으로 확인되어 *Bacillus* 속에 속하는 것으로 판단되었다. 주사전자현미경($\times 10,000$)의 촬영(Fig. 1)에 의해 본 균주는 크기가 1.7 μ m \times 0.5 μ m인 간균으로 확인되었다. 또한 미생물의 탄소원 이용성에 기초를 둔 Biolog사의 Microstation Microbial Identification System™을 이용하여 동정을 실시한 결과, 본 균주는 *Bacillus alcalophilus*로 동정되었으며(Similarity 0.932, Distribution 3.12, Average Distribution 0.39, Maximum Distribution 1.48), gas chromatography를 이용하여 세포막 지방산 조성을 분석한 결과에서도 *B. alcalophilus*와 0.912의 유사도를 보였다(data not shown). 한편 본 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 다른 균주와 비교한 후 계통수를 도식화한 결과 Fig. 2와 같이 *B. alcalophilus*와 유사성이 가장 높은 것으로 나타났다. 이상의 여러 가지 특성을 관찰한 결과 본 균주는 *B. alcalophilus*에 속하는 것으로 판단하였으며 이에 본 균주를 *B. alcalophilus* AX2000으로 명명하였다.



Fig. 1. Scanning electron micrograph ($\times 10,000$) of *B. alcalophilus* AX2000.

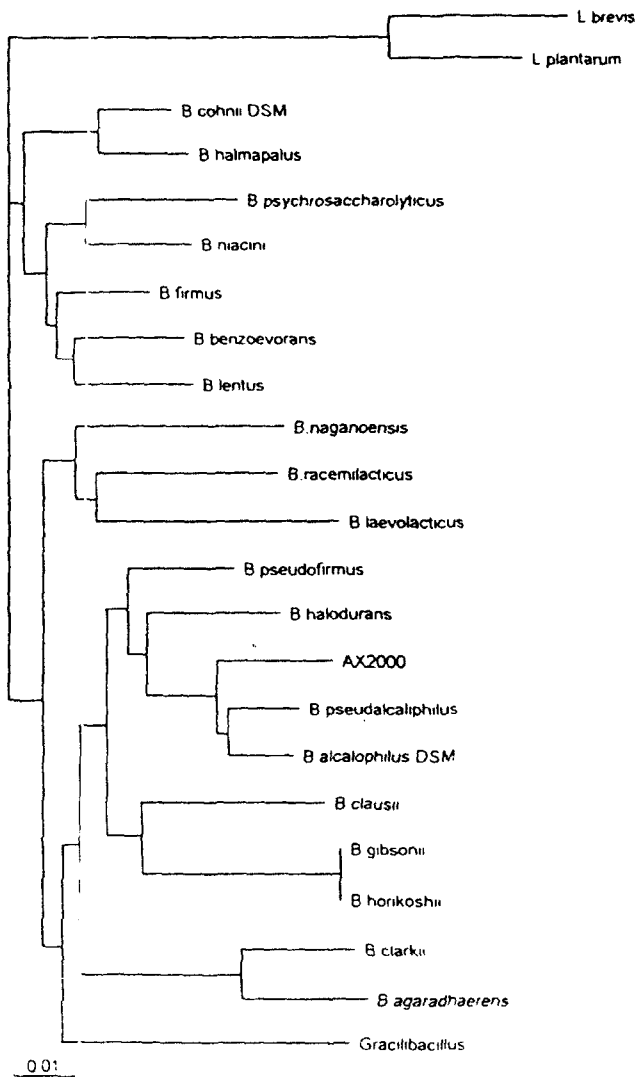


Fig. 2. Phylogenetic tree of *B. alkalophilus* AX2000 based on 16S rRNA sequence analysis.

본 연구에서 xylanase를 생산하는 균주를 탐색하였을 때 분리배지의 pH를 10.5로 조정하여 알칼리 조건에서 수행하였다. 이에 pH에 따른 균의 성장과 효소활성을 조사해본 결과 pH 7에서는 성장을 하지 못했고 pH 8부터 성장이 시작되어 pH 10.5에서 가장 성장이 좋았으며 효소의 활성도 높은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 균주는 알칼리 내성균이며 생산하는 효소 역시 알칼리성 xylanase임을 알 수 있었다. 온도에 따른 균주의 생육도와 효소생산량을 조사해 본 결과, 본 균주는 25°C부터 40°C까지의 범위에서 정상적으로 생육할 수 있었으며 효소활성도 37°C에서 가장 높은 값을 나타내어 중온균임을 알 수 있었다(data not shown).

탄소원의 종류에 따른 효소생산의 영향

미생물이 생산하는 분해효소는 배지에 존재하는 탄소원에 의해 그 생산성이 영향을 많이 받는데 xylanase의 경우에도

Table 1. Effect of carbon source on the xylanase production.

Carbon source (1%, w/v)	Cell growth (OD ₆₀₀)	Xylanase activity		Xylanase activity /OD ₆₀₀
		U/ml	(%)	
None	1.15	— ^a	—	—
Glucose	1.59	—	—	—
Fructose	1.91	—	—	—
Maltose	1.97	—	—	—
Xylose	1.31	—	—	—
Galactose	1.39	—	—	—
Mannose	1.57	—	—	—
Arabinose	1.39	0.10	46	0.07
Ribose	0.92	—	—	—
Raffinose	1.26	—	—	—
Sucrose	1.80	—	—	—
Lactose	1.64	—	—	—
Glycerol	1.19	0.01	2	0.01
Mannitol	1.57	0.02	7	0.01
Oat-spelts xylan	1.02	0.16	74	0.16
Birchwood xylan	1.50	0.22	100	0.14
Soluble starch	1.69	0.02	9	0.01
Carboxymethyl cellulose	1.02	—	—	—

^aNot detectable.

xylan 또는 다른 탄소원을 첨가한 배지에서 탄소원의 종류에 따라 효소의 생산이 유도되거나 구성적으로 생산된다. 따라서 탄소원이 결핍된 기본배지에 여러 가지 종류의 탄소원을 1%(w/v) 첨가하여 탄소원에 따른 xylanase의 생산을 조사한 결과 Table 1과 같이 탄소원을 첨가하지 않았을 경우 질소원인 polypeptone와 yeast extract 성분을 이용하여 균의 생육은 가능하였으나 효소 활성은 나타나지 않았다. Xylanase 생산성은 birchwood xylan을 유일한 탄소원으로 첨가하였을 경우 가장 좋았으며 birchwood xylan의 첨가농도에 따른 효소 생산성은 0.5%(w/v)의 농도에서 가장 좋았다(data not shown). Oat-spelts xylan을 첨가했을 경우에는 74%의 활성만을 유도할 수 있었는데 이는 xylan의 구조적인 차이에 의해 이용도가 달라지기 때문이라 생각된다.

Xylan은 그 구조적 특성에 따라 두 가지로 나눌 수 있는데 일반적으로 hardwood에는 acetylated xylan의 형태로, softwood에는 arabinoxylan으로 존재한다[32]. Acetylated xylan은 적어도 70개의 β-1,4-linked *D*-xylopyranose 잔기를 기본골격으로 하여 10개의 잔기마다 2번 위치에 하나의 4-*O*-methyl-α-*D*-glucuronic acid 단위를 지니고 있고 *O*-acetyl기가 β-*D*-xylopyranose 잔기와 1→2 또는 1→3 결합을 하고 있어 4-*O*-methyl-α-*D*-glucuronic acid와 acetyl기가 각각 xylose 잔기의 약 10%와 70% 비율로 존재하고 있다. 한편 arabinoxylan은 13개의 (1→4)-linked β-*D*-xylopyranose 잔기를 기본골격으로 하여 3개의 (1→2)-linked 4-*O*-methyl-α-*D*-glucuronic acid 단위와 하나의 (1→3)-linked L-arabinofuranose

단위를 지니고 있어 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid와 arabinose 잔기가 각각 xylose 잔기의 약 18%와 12% 비율로 존재하고 있다[3, 35]. 본 실험에 사용된 oat-spelts xylan은 그 구조에 약 10%의 arabinose와 15%의 glucose 잔기를 함유하고 있는데 반해 birchwood xylan은 대부분의 잔기들이 xylose로 이루어져 있다.

본 균주는 xylan 이외에 arabinose, soluble starch, mannitol, glycerol 등을 탄소원으로 이용하였을 경우 xylanase의 생산이 약간 유도되었고 그 이외의 탄소원들은 xylanase의 생산을 전혀 유도하지 못하여 xylanase의 생합성이 매우 제한적으로 이루어지고 있음을 알 수 있었다. 이 결과로부터 본 균주가 생산하는 xylanase는 기질인 xylan이 반드시 존재해야 그 생합성이 이루어지는 유도 효소인 것으로 확인되었다. Panbangred 등[19]은 *B. pumilus*가 생산하는 xylanase는 xylose에 의해 유도되며 glucose에 의해 그 생합성이 저해된다고 하였고, Roncero 등[23]은 *B. subtilis* xylanase는 glucose나 xylose에 의해 활성이 완전히 저해된다고 보고하였다. 또한 *Aspergillus awamori*[28]와 *Streptomyces* sp. QG-11-3[2]은 xylan에 의해, *Sclerotium rolfsii*[25]와 *Tricoderma reesei*[36]는 sorbose에 의해 xylanase의 생합성이 유도된다고 보고되었다. 따라서 본 연구에 사용된 *B. alcalophilus* AX2000은 Panbangred 등이 보고한 *B. pumilus*가 생산하는 xylanase와 그 생합성 특성에 있어서 큰 차이가 있고 *A. awamori* xylanase와는 유사함을 알 수 있었다.

세포 증식에 있어서도 birchwood xylan을 탄소원으로 이용하였을 경우 비교적 좋은 생육도를 보여주었으나 oat-spelts xylan이나 ribose 등은 오히려 균주의 생육을 저해하는 것으로 나타났다.

Glucose 농도에 의한 효소 생합성의 영향

효소 생합성의 catabolite repression에 관여하는 당당류인 glucose가 xylanase의 생산에 어떤 영향을 미치는 알아보기 위하여 0.5%(w/v)의 birchwood xylan을 탄소원으로 첨가한 기본배지에 일정 농도의 glucose를 첨가한 후, 본 균주를 접종하여 36시간 배양한 다음 배양 상등액의 xylanase 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 0.5%(w/v)의 glucose 농도에서는 birchwood xylan만을 첨가하여 xylanase의 생산을 유도시킨 경우보다 2.5배 높은 효소 생합성을 나타내었으나 1%(w/v) 이상의 고농도에서는 생합성이 급격히 감소하여 catabolite repression을 받는 것으로 나타났다. *Bacillus* 속 균주는 포자형성, 효소전달체거나 세포의 합성 등의 세포성장과정 중에 catabolite repression을 받는 것으로 알려져 있다[27]. Catabolite repression은 glucose 등과 같이 간단히 이용되는 탄소원의 존재시 분해 관련 효소 생합성이 억제되는 것을 말하는데[12, 16, 20] *E. coli*의 경우 cyclic AMP(cAMP)를 고농도로 첨가했을 때 glucose에 의한 repression이 해제되어 cAMP가 catabolite repression에

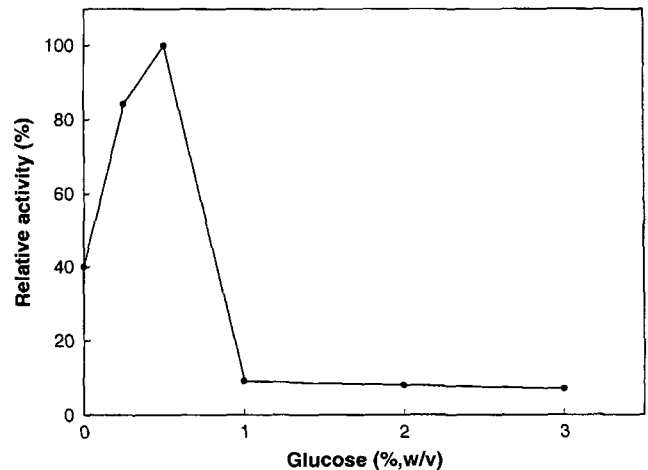


Fig. 3. Effect of glucose concentration on the xylanase production.

중요한 역할을 한다는 PTS 기구가 잘 알려져 있다[4, 17, 24, 26]. 그러나 *Bacillus* 속 균주에서는 glucose에 의한 catabolite repression 작용기작이 정확하게 알려져 있지 않는데, Laoide 등[15]은 *B. licheniformis amyL* 유전자의 catabolite repression은 전사과정 중에 일어나며 catabolite repression 관여 가능한 조절 단백질이 전사초기위치 근처에 존재하는 cis-acting 부위에 결합하여 glucose 존재시 전사를 지연시킨다고 제시하였다. 이러한 과정에는 HPr kinase가 관여하는데 fructose-1,6-bisphosphate(FBP)에 의해 활성화된 HPr kinase가 HPr을 인산화시키고 인산화된 HPr에 catabolite 조절단백질인 CcpA와 FBP가 결합되어 복합체를 형성한 후 cis-acting 부위인 catabolite repression element (CRE)에 부착함으로써 해당 유전자의 전사를 방해한다고 알려져 있다[5-7, 21]. 본 실험에 사용된 *B. alcalophilus* AX2000의 xylanase 효소에 대한 catabolite repression 기작을 연구하기 위해서는 xylanase 유전자를 클로닝하여 이 유전자에 존재하는 cis-acting 부위를 조사하는 것이 필요하며, 본 균주로부터 catabolite repression에 관여하는 trans-acting 조절단백질을 생합성하는 유전자의 분리가 요구된다.

질소원의 종류에 따른 효소생산의 영향

질소원에 따른 균주의 xylanase 생산성을 조사하기 위하여 1.0%(w/v)의 birchwood xylan을 탄소원으로 첨가하고 질소원이 결핍된 기본배지에 여러 가지 종류의 무기질소원과 유기질소원을 1.0%(w/v)가 되도록 첨가한 후 배양 상등액의 효소활성을 측정하였다. 그 결과 질소원을 첨가하지 않았을 경우에는 균의 생육이 전혀 이루어지지 않아 탄소원으로 첨가한 1.0%(w/v)의 birchwood xylan만으로는 균이 생육되지 않음을 알 수 있었으며 무기질소원을 첨가하였을 경우에도 균의 생육이 매우 저조하고 xylanase의 생합성이 전혀 이루어지지 않아 균의 생육과 효소 생산을 위해서는 반드시 유

기질소원을 첨가해야 함을 알 수 있었다. 유기질소원 중에서는 polypeptone과 yeast extract를 각각 0.5%(w/v)씩 첨가하였을 경우 가장 높은 효소 생합성을 나타내었으며 세포의 성장도 가장 좋음을 알 수 있었다(Table 2). Polypeptone과 yeast extract의 첨가농도에 따른 효소 생합성 정도는 polypeptone과 yeast extract를 동일 비로 하여 0.5%(w/v) 첨가한 농도에서 가장 좋음을 알 수 있었다(data not shown). 이상의 결과로부터 본 균주를 이용하여 효소를 생산하기 위한 최적 배지조건은 0.5% birchwood xylan, 0.5% glucose, 0.25% polypeptone, 0.25% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1% Na_2CO_3 , pH 10.5로 결정하였다.

Xylanase 생산의 time course

본 연구에서 결정한 최적생산배지를 이용하여 배양시간에 따른 균의 생육도와 효소생산을 조사하였다. 하룻밤 배양한 종 배양액을 최적생산배지에 1%(v/v) 접종하여 37°C에서 배양하면서 균의 생육과 효소활성을 비교 검토한 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이 배양 후 4시간부터 대수증식기에 들어가 14시간에 정지기에 도달하였다. 효소생산은 배양 후 16시간부터 급속히 생산하기 시작하여 24시간부터 일정한 수준을 유지하였다.

Xylose 농도에 따른 효소 생합성의 영향

Xylanase가 기질인 xylan을 분해하여 생성되는 최종 산물인 xylose가 효소의 생합성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 0.5%(w/v)의 birchwood xylan을 탄소원으로 첨가한 기본배지에 일정 농도의 xylose를 첨가한 후 본 균주를 접종하여 24시간 배양한 다음 배양 상등액의 xylanase 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 5에서 나타낸 바와 같이 xylose의 농도가 증가함에 따라 효소의 활성이 감소하여 2%(w/v)의 xylose 농도에서는 xylanase의 활성이 30% 수준으로 감소하였다. 이 결과로부터 본 효소는 최종산물인

xylose에 의해 feedback inhibition을 받는다고 판단되었다. *S. rolfii*[25]와 *T. reesei*[36]가 생산하는 xylanase는 xylose에 의해 생합성이 유도되고 *Bacillus* sp. AMX-4[37]는 xylose를 탄소원으로 배지 중에 첨가하였을 경우 첨가하지 않았을 때보다 xylanase의 생산성이 15배 정도 증가되어 xylose가 xylanase 생합성의 유도제로 작용한다고 보고하였으며 Panbangred 등[19]은 *B. pumilus*가 생산하는 xylanase는 xylose에 의해 유도된다고 보고하여 본 연구 결과와는 상이한 결과를 보였다. 한편 Roncero 등[23]은 *B. subtilis* xylanase는 xylose에 의해 활성이 완전히 저해된다고 보고하여 본 연구 결과와 유사한 결과를 나타내었다.

Xylanase 활성의 최적 pH 및 pH 안정성

본 실험에 사용된 균주가 생산하는 xylanase의 효소적 특성을 경시적으로 관찰하기 위하여 최적생산배지에서 24시간 동안 배양한 배양 상등액을 조효소액으로 사용하여 효소반응의 최적 pH와 pH 안정성을 조사하였다. 효소반응의 최적

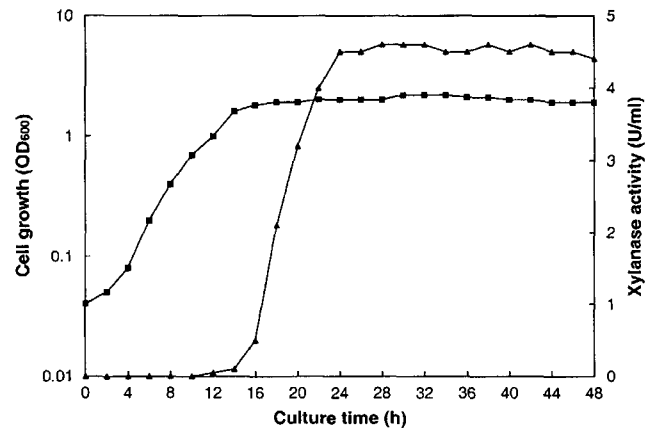


Fig. 4. Time course of xylanase production. ■, Cell growth; ▲, xylanase activity.

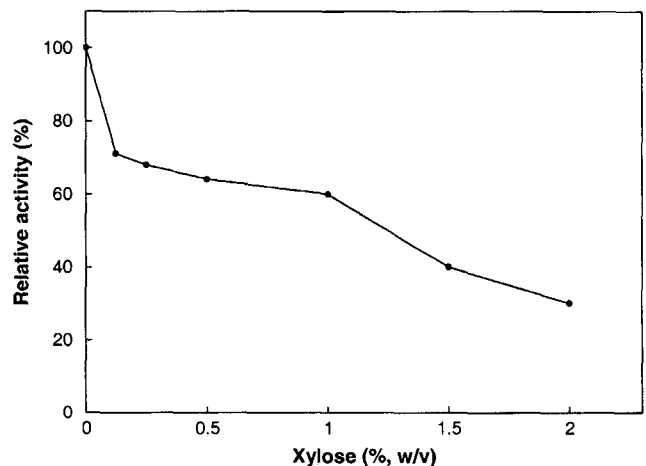


Fig. 5. Effect of xylose concentration on the xylanase production.

Table 2. Effect of nitrogen source on the xylanase production.

Nitrogen source (1%, w/v)	Cell growth (OD ₆₀₀)	Xylanase activity		Xylanase activity/ OD ₆₀₀
		U/ml	(%)	
None	— ^a	—	—	—
Polypeptone	1.29	0.24	92	0.19
Yeast extract	1.27	0.12	47	0.10
Polypeptone(0.5%)+ Yeast extract(0.5%)	1.38	0.26	100	0.19
Malt extract	—	—	—	—
Soytone	1.05	0.17	65	0.16
Casamino acid	1.19	0.15	59	0.13
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.43	—	—	—
NH ₄ Cl	0.16	—	—	—
NH ₄ NC ₃	0.17	—	—	—

^aNot detectable.

pH를 알아보기 위하여 pH 3~7까지는 10 mM citrate-phosphate 완충용액, pH 7~9까지는 10 mM Tris-HCl 완충용액, pH 9~11까지는 10 mM sodium bicarbonate 완충용액을 사용하여 기질용액을 만든 후 효소액과 반응시켜 효소활성을 측정하고 Fig. 6A에서와 같이 pH 10에서 최대활성을 나타낸 반면 중성 조건에서는 효소의 활성이 매우 낮아 본 효소는 알칼리성 효소임을 알 수 있었다. 곰팡이 유래의 xylanase는 넓은 pH 범위에서 최적활성을 유지하고 세균 유래의 xylanase는 일반적으로 곰팡이 유래의 xylanase보다 높은 pH에서 최적활성을 지니는 것으로 알려져 있다. 호알칼리성 *Bacillus* sp. C-59-2의 xylanase[9]는 pH 6~8에서 최대활성을 나타내며 *B. pumilus* IPO[19]의 경우 pH 6.5에서, *Aspergillus niger* str. 14[8]의 경우에는 pH 4.0에서 최대활성을 나타낸다고 보고되어 있다. 또한 호알칼리성 *Bacillus* 41M-1[18]이 생산하는 xylanase는 pH 9에서 최적활성을 나타내었으며, *Bacillus* sp. C-59-2[9]의 경우 pH 5.5~9.0, *B. stearothermophilus*가 생산하는 xylanase는 pH 7.0[11], *Aeromonas* sp. 212[13]의 경우에는 pH 7.0~8.0에서 최적활성을 나타낸다고 보고되어 본 연구에서 사용된 균주는 다른 알칼리 내성 세균이 생산하는 xylanase보다 높은 알칼리 조건에서 최적 pH를 지니는 효소를 생산함을 알 수 있었다. 효소의 pH 안정성을 조사하기 위해 각 pH 별로 제조한 완충용액에 효소용액을 가해 40°C에서 30분간 방치한 후 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액으로 pH를 조정하고 후 효소의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 6A에서와 같이 본 효소는 pH 5~11에서 80% 이상의 잔존활성을 나타내었는데 호알칼리성 *Bacillus* sp. C-59-2의 xylanase[9]는 pH 5~11에서, *B. pumilus* IPO[19]의 경우 pH 5~9에서, *A. niger* str. 14[8]의 경우에는 pH 5~10의 범위에서 안정하다고 보고된 바 있어 본 효소는 상기 균주들로부터 유래된 효소들보다 넓은 pH 범위에서 효소 활성이 안정하게 유지됨을 알 수 있었다.

Xylanase 활성의 최적 온도 및 안정성

Xylanase 효소활성의 최적 온도와 온도 안정성을 살펴보기 위하여 최적생산배지에서 24시간 동안 배양한 배양상등액을 조효소액으로 사용하여 20~80°C까지의 각 온도별로 효소활성을 측정하고 50°C에서 최대활성을 나타내었다(Fig. 6B). 곰팡이 유래의 xylanase는 열 안정성이 높아서 대개 70°C 이상에서만 완전히 불활성화되는데 *Gloephyllum trabeum*[22]은 80°C에서 최적활성을 나타낸다고 보고된 바 있다. 중온성 세균 유래의 xylanase는 대개 50~60°C 범위에서 최적활성을 나타내며 65°C 이상에서는 불활성화된다. 호알칼리성 *Bacillus* sp. C-59-2[9]가 생산하는 xylanase는 60°C에서, *B. pumilus* IPO[19]의 경우에는 45~50°C에서 최대활성을 나타내며, *A. niger* str. 14[8], *Aeromonas* sp. 212[13], *Bacillus* 41M-1[18]이 생산하는 xylanase는 50°C

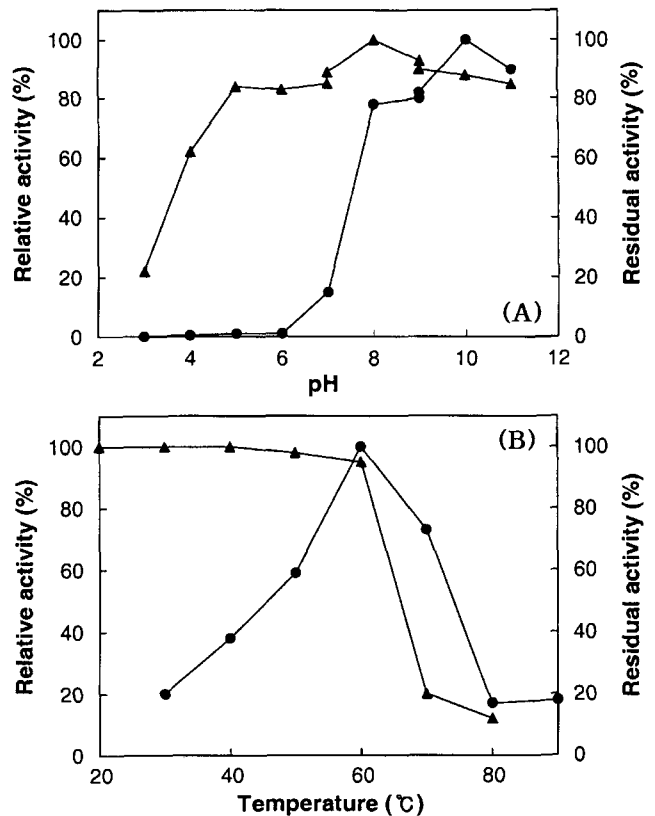


Fig. 6. Effect of pH(A) and temperature(B) on the activity and stability of the xylanase. The buffers used were 10 mM citrate-phosphate buffer (pH 3~7), 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7~9), and 10 mM sodium bicarbonate buffer (pH 9~11). The enzyme solution was incubated at indicated buffers for 30 min at 40 for the pH stability and incubated at indicated temperature for 30 min for the thermal stability. The remaining activity was determined under the standard condition. ●, Relative activity; ▲, residual activity.

에서 최적활성을 나타낸다고 보고되어 본 효소와 동일한 최적온도를 보였다.

효소의 열 안정성을 조사하기 위해서 각 온도별로 효소용액을 30분간 처리한 후 잔존활성을 측정하고 Fig. 6B에서와 같이 20°C에서 60°C에 걸쳐 90% 이상의 잔존활성을 나타내었고 70°C에서는 효소활성이 상당히 감소하여 20% 정도의 잔존활성을 나타내었다. 곰팡이 유래의 xylanase는 열 안정성이 높아서 *G. trabeum*[22]은 80°C에서 최적활성을 나타낸다. 그러나 중온성 세균의 경우 65°C에서 대개 xylanase는 불활성화된다. 호알칼리성 *Bacillus* sp. C-59-2의 xylanase[9]는 30~60°C에서 안정하였으며, *B. pumilus* IPO[19]의 경우 50°C에서 30분간 처리하였을 때 50%의 활성을 유지하였으며, *Talaromyces byssochlamydoideis* YH-50이 생산하는 xylanase[38]는 70°C까지 효소활성이 100% 유지되었고 95°C에서 5분간 처리하여도 30% 이상의 잔존활성을 보여 내열성을 나타내었다. 이상의 실험결과로부터 *B. alcalophilus* AX2000이 생산하는 xylanase는 상기 균주들이

생산하는 효소들보다 내열성이 다소 낮음을 알 수 있었으나 보다 정확한 효소적 특성 규명을 위하여 효소의 순수정제를 수행 중에 있다.

요 약

알칼리성 xylanase를 생산하는 균주를 토양으로부터 분리한 후 동정을 실시한 결과 *Bacillus alcalophilus*으로 판명되었다. *B. alcalophilus* AX2000으로 명명한 본 균주는 pH 10.5에서 생육이 가장 좋았으며 효소활성도 가장 높았고 배지 중에 탄소원과 질소원으로서 0.5%(w/v) birchwood xylan과 0.5%(w/v) polypeptone/yeast extract를 각각 사용하였을 경우에 최대의 xylanase 생산성을 나타내었다. Xylanase의 생합성은 glucose에 의한 catabolite repression을 받았으며 고농도의 xylose에 의해 효소의 생합성이 저해되었다. 조효소의 최적활성은 pH 10과 50°C에서 나타났으며, pH 5에서 11까지의 넓은 pH 범위에서 활성이 안정하게 유지되었고 효소의 열 안정성은 20~60°C에서 30분간 처리시 90% 이상의 잔존활성을 나타내었다.

REFERENCES

- Aspall, G. O. 1995. Structural chemistry of the hemicelluloses. *Adv. Carbohydr. Chem.* **14**: 429-468.
- Beg, Q. K., B. Bhushan, M. Kapoor, and G. S. Hoondal. 2000. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 396-402.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 286-290.
- Botsford, J. L. 1981. Cyclic nucleotides in procaryotes. *Microbiol. Rev.* **45**: 620-642.
- Chauvaux, S. 1996. CcpA and HPr(ser-P): Mediators of catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *Res. Microbiol.* **147**: 518-522.
- Deutscher, J., E. Kuster, U. Bergstedt, V. Charrier, and W. Hillen. 1995. Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **15**: 1049-1053.
- Do, E. J., H. D. Shin, C. Kim, and Y. H. Lee. 1993. Selection and characterization of catabolite repression resistant mutant of *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* producing cyclodextrin glucanotransferase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 78-85.
- Gorbacheva, I. V. and N. A. Rodionova. 1977. Studies on xylan degrading enzymes. I. Purification and characterization of endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus niger* str. 14. *Biochim. Biophys. Acta* **484**: 79-93.
- Horikoshi, K. and Y. Atsukawa. 1973. Xylanase produced by alkalophilic *Bacillus* no. C-59-2. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 2097-2103.
- Jose H. B., F. Fava-De-Moraes, and G. M. Zanin. 1999. Bleaching of kraft pulp with commercial xylanase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **77**: 713-722.
- Khasin, A., I. Alchanati, and Y. Shoham. 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1725-1730.
- Kraus A. and E. Kuster. A. Wagner, K. Hoffmann, and W. Hillen. 1998. Identification of a co-repressor binding site in catabolite control protein CcpA. *Mol. Microbiol.* **30**: 955-963.
- Kudo, J. and K. Ohkoshi. 1985. Molecular cloning and expression of a xylanase gene of alkalophilic *Aeromonas* sp. No. 212 in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **13**: 2825-2830.
- Kulkarni, N., A. Shendye, and M. Rao. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**: 411-456.
- Laoide B. M. and D. J. J. McConnell. 1989. Cis sequences involved in modulating expression of *Bacillus licheniformis amyL* in *Bacillus subtilis*: Effect of sporulation mutations and catabolite repression resistance mutations on expression. *J. Bacteriol.* **171**: 2443-2450.
- Magasanik, B. 1970. Glucose effects: inducer exclusion and repression, pp. 189-219. In J. R. Beckwith and D. Zipser (ed.), *The lactose operon*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Meadow, N. D., D. K. Fox, and S. Roseman. 1990. The bacterial phosphoenolpyruvate: glycosyl phosphotransferase system. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 497-542.
- Nakamura, S., R. Nakai, K. Wajabatacgu, Y. Ishiguro, R. Ano, and K. Horikoshi. 1994. Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alkalophilic and thermophilic *Bacillus* sp. strain TAR-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**: 78-81.
- Panbangred, W., A. Shinmyo, S. Kinoshita, and H. Okada. 1983. Purification and properties of endoxylanase produced by *Bacillus pumilus*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 957-963.
- Postma, P. W., J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 543-594.
- Reizer, J., A. H. Romano, and J. Deutscher. 1993. The role of phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, in the regulation of carbon metabolism in Gram-positive bacteria. *J. Cell. Biochem.* **51**: 19-24.
- Ritschkoff, A. C., J. Buchert, and L. Viikari. 1994. Purification and characterization of a thermophilic xylanase from the brown-rot fungus *Gleophyllum trabeum*. *J. Biotechnol.* **32**: 67-74.
- Roncero, M. I. 1983. Genes controlling xylan utilization by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **156**: 257-263.
- Roseman, S. and N. D. Meadow. 1990. Signal transduction by the bacterial phosphotransferase system. *J. Microbiol.* **265**: 2993-2996.

25. Sachslehner, A., B. Nidetzky, K. D. Kulbe, and D. Haltrich. 1998. Induction of mannanase, xylanase and endoglucanase activities in *Sclerotium rofsii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 594-600.
26. Saier, M. H. Jr. 1991. A multiplicity of potential carbon catabolite repression mechanisms in prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *The New Biologist* **3**: 1137-1147.
27. Saier, M. H., Jr. 1998. Multiple mechanisms controlling carbon metabolism in bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 170-174.
28. Siedenberg, D., S. R. Gerlach, K. Schugerl, M. L. F. Giuseppe, and J. Hunik. 1998. Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in shake flask cultures. *Process Biochem.* **33**: 429-433.
29. Somogyi, M. 1952. Note on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
30. Sunna, A. and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**: 39-67.
31. Timell, T. E. 1965. Wood hemicelluloses: Part . *Carbohydr. Chem.* **20**: 409-483.
32. Timell, T. E. 1967. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci. Technol.* **1**, 45-70.
33. Wong, K. K. Y. and J. N. Saddler. 1992. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries, pp. 127-143. *In* Coughlen, P. P. and G. P. Hazlewood (ed.), *Hemicellulose and Hemicellulases*, Portland Press, London.
34. Wong, K. K. Y., L. U. L. Tan, and J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganism: functions and applications. *Microbiol. Rev.* **52**: 305-317.
35. Woodward, J. 1984. Xylanases: functions, properties and applications. *Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.* **8**: 9-30.
36. Xu, J., Nogawa, H. Okada, and Y. Morikawa. 1998. Xylanase induction by L-sorbose in a fungus *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 1555-1559.
37. Yoon, K. H., S. J. Seol, H. C. Cho, M. S. Lee, J. H. Choi, and K. H. Cho. 2002. Isolation and enzyme production of a xylanase-producing strain, *Bacillus* sp. AMX-4. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 123-128.
38. Yoshioka, H., N. Nagato, S. Chavanich, N. Nilubol, and S. Hayashida. 1981. Purification and properties of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 2425-2432.

(Received Apr. 8, 2003/Accepted May 20, 2003)